

Requested Patent: DE4104014A1

Title:

DETERMINING ABSOLUTE INTRACELLULAR CALCIUM ION CONC. - BY  
STAINING WITH CALCIUM SENSITIVE FLUORESCENT DYE THEN SCANNING  
FLUORESCENCE DECAY OF COMPLEXED AND FREE DYE ;

Abstracted Patent: DE4104014 ;

Publication Date: 1991-08-22 ;

Inventor(s): WABNITZ HEIDRUN DR (DE) ;

Applicant(s): JENOPTIK JENA GMBH (DE) ;

Application Number: DE19914104014 19910209 ;

Priority Number(s): DD19900337901 19900216 ;

IPC Classification: C12Q1/00 ; G01N21/64 ; G01N33/84 ;

Equivalents: DD292084

ABSTRACT:

Determination of intracellular Ca ion concn by a scanning microscope comprises first staining the cells with an indicator (I) which responds to a change in Ca ion concn by a change in fluorescence quantum yield. Fluorescence is excited with a short pulse of light and the time-resolved spectrum recorded. By evaluating the decay process the ratio of the two fluorescent components (corresponding to free (I) and Ca-complexed (II)) is determined, and from this ratio the Ca concn is calculated. USE/ADVANTAGE - The method is used in cell biology and neurobiology. Absolute values of Ca ion concn can be determined without the need for a difficult calibration procedure as required in known methods.



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 41 04 014 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**G 01 N 21/64**  
G 01 N 33/84  
C 12 Q 1/00  
// C12N 5/00

②① Aktenzeichen: P 41 04 014.7  
②② Anmeldetag: 9. 2. 91  
④③ Offenlegungstag: 22. 8. 91

DE 41 04 014 A 1

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
16.02.90 DD WP G 01 N/337901

⑦① Anmelder:  
Jenoptik Carl Zeiss Jena GmbH, O-6900 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Wabnitz, Heidrun, Dr., O-6900 Jena, DE

⑤④ Verfahren zur Bestimmung von Calciumionenkonzentration in Zellen

⑤⑦ Verfahren zur Bestimmung von Calciumkonzentrationen in Zellen. Das Verfahren ermöglicht die absolute Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in biologischen Materialien mit Hilfe solcher Indikatorfarbstoffe, die auf eine Konzentrationsänderung mit einer Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute reagieren. Die Lösung besteht darin, daß die Zellen mit einem solchen Indikatorfarbstoff eingefärbt und dann mit kurzen Lichtimpulsen zur Fluoreszenz angeregt werden, das Fluoreszenzlicht mit zeitlicher Auflösung registriert wird und durch Auswertung des Abklingverhaltens das Verhältnis der Anteile der beiden Fluoreszenzkomponenten, die dem freien Farbstoff einerseits und dem Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex andererseits entsprechen, und daraus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt werden.

DE 41 04 014 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Bestimmung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Calcium nimmt eine zentrale Stellung bei der biochemischen Signalübertragung auf zellulärer Ebene ein; es steuert die Aktivierung von Transmittern, Enzymen oder Hormonen ausgehend von Potentialänderungen oder Rezeptoren in tierischen und pflanzlichen Zellen. Die Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Zellinneren ist deshalb von herausragender Bedeutung in der experimentellen Zellbiologie und Neurobiologie.

Es sind verschiedene Verfahren zur Bestimmung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bekannt, die auf dem Einsatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Mikroelektroden, Biolumineszenz von Biopolymeren und Fluoreszenzindikatoren beruhen.

Die letztgenannte Methode wird wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und ihres Verzichts auf mechanische Eingriffe in den letzten Jahren in wachsendem Maße breit eingesetzt. Sie beruht auf der Verwendung von speziellen Sondenfarbstoffen, die eine hohe Affinität und Selektivität für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie eine möglichst effiziente Fluoreszenz mit starker Änderung von Fluoreszenzparametern bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Anlagerung aufweisen. Die Fluoreszenzregistrierung wird mit mikroskopischen oder durchflußzytometrischen Verfahren kombiniert. Dabei ist das Verfolgen von Aktivierungsprozessen im Echtzeitbetrieb zusammen mit räumlicher Darstellung ("optical recording") von besonderem Interesse. Es wurden spezielle Mikroskopphotometer entwickelt, mit denen für solche Indikatorfarbstoffe, die eine deutliche spektrale Änderung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aufweisen, aus der Fluoreszenzmessung bei zwei verschiedenen Anregungs- bzw. Fluoreszenzwellenlängen mittels eines Quotientenverfahrens auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geschlossen wird (DE 36 04 815; Nature 318 [1985], 558—561).

Der Einsatz der Laserrastermikroskopie ist vor allem im Zusammenhang mit der Möglichkeit der 3D-Auflösung und Tiefendiskriminierung attraktiv.

Einige wenige Indikatorfarbstoffe haben sich in der breiten Anwendung durchgesetzt (J. Biol. Chem., 260 [1985], 3440—3450; Biochem. J., 248 [1987], 313—328; Trans. in Neurosci., 11 [1988], 419—424). Bei den Farbstoffen "fura-2" und "indo-1" ändert sich im wesentlichen das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Anlagerung, bei "quin-2" und "fluo-3" die Fluoreszenzquantenausbeute. Während die übrigen Farbstoffe im UV-Bereich angeregt werden müssen, bietet "fluo-3" den entscheidenden Vorzug, im sichtbaren Wellenlängenbereich um 500 nm anregbar zu sein. Das ist einerseits hinsichtlich der Verfügbarkeit von Lichtquellen (Argonlaser) sowie optischen Bauelementen günstig. Andererseits entfällt weitestgehend die bei Anregung im nahen UV-Bereich störend in Erscheinung tretende Eigenfluoreszenz von Zellen. Zudem wird der parallele Einsatz von UV-Strahlung, z. B. zur photostimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, möglich.

Die Absolutbestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels solcher Farbstoffe, die keine wesentliche Spektrenverschiebung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Anlagerung aufweisen, ist jedoch mit einer außerordentlich komplizierten, zeitaufwendigen und zellschädigenden Eichprozedur verbunden.

Es ist eine absolute Intensitätsmessung nötig, die durch lokale oder zeitliche Änderungen

- der Farbstoffkonzentration,
- der optischen Weglänge in der Zelle,
- der Anregungsintensität,
- der Detektorempfindlichkeit

beeinträchtigt wird. Unter Erhaltung dieser Bedingungen ist für jedes konkrete Objekt in situ die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten für praktisch verschwindende und sehr hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erforderlich. Die von "Mol. Probes Inc." dafür angegebene Eichprozedur beinhaltet einen z. B. durch dosierte Zugabe von Ionomycin ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem umgebenden Medium bis in den Sättigungsbereich; anschließend wird durch  $\text{Mn}^{2+}$ -Zugabe die Fluoreszenz gelöscht, um einen Bezug zu dem Wert ohne  $\text{Ca}^{2+}$  zu erhalten.

Ziel der Erfindung ist die Senkung des Aufwandes für Eichprozeduren und Herabsetzung der damit verbundenen Belastung des Zellmaterials bei der absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzindikatoren.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem die absolute Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in biologischen Materialien mit Hilfe solcher Indikatorfarbstoffe, die auf eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute reagieren, unter Vermeidung sonst üblicher aufwendiger Eichprozeduren gelingt.

Die Lösung gelingt erfindungsgemäß dadurch, daß die Zellen mit einem solchen Indikatorfarbstoff, der auf eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute reagiert, eingefärbt und dann mit kurzen Lichtimpulsen zur Fluoreszenz angeregt werden, das Fluoreszenzlicht mit zeitlicher Auflösung registriert wird und durch Auswertung des Abklingverhaltens das Verhältnis der Anteile der beiden Fluoreszenzkomponenten, die dem freien Farbstoff einerseits und dem Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex andererseits entsprechen, und daraus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt wird.

In der flüssigen Lösung, deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zu bestimmen ist (Cytosol der Zellen), liegen nach Zugabe des Indikatorfarbstoffes freie Farbstoffanionen (FS; Index 1) und Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexe (FSCa; Index 2) im chemischen Gleichgewicht vor. Ihr Konzentrationsverhältnis hängt in bekannter Weise gemäß dem Massenwirkungsgesetz mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die Dissoziationskonstante  $K_D$  zusammen

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot c_2/c_1 \quad (1)$$

hierbei ist 1 : 1-Stöchiometrie des Komplexes vorausgesetzt.

Die Messung hat die Aufgabe, das Verhältnis  $c_2/c_1$  zu ermitteln; erfindungsgemäß wird dazu die zeitaufgelöste Registrierung des Abklingens der Fluoreszenz herangezogen.

Ursache für eine bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eintretende Änderung der Quantenausbeute bzw. Intensität der Fluoreszenz des Indikatorfarbstoffes sind Veränderungen der Raten verschiedener Relaxationsprozesse aus dem angeregten Zustand der Farbstoffmoleküle. Diese bestimmen andererseits die Lebensdauer des angeregten Zustandes, die insbesondere als Abklingzeit der Fluoreszenz nach Impulsanregung der Beobachtung zugänglich ist. Deshalb sind für solche Indikatorfarbstoffe, von denen bekannt ist, daß sie auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mit einer erheblichen Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute reagieren (insbesondere quin-2 und fluo-3), auch deutliche Unterschiede der Fluoreszenzabklingzeiten für FS und FSCa zu erwarten.

Die Fluoreszenzintensität bei gleichzeitigem Vorliegen von FS und FSCa hat unter der Voraussetzung, daß nur diese beiden Spezies fluoreszieren und jeweils einfach-exponentielles Abklingverhalten aufweisen, einen zeitlichen Verlauf der Form

$$I_F(t) = a(c_1 \cdot k_{F1} \cdot \exp\{-t/\gamma_1\} + c_2 \cdot k_{F2} \cdot \exp\{-t/\gamma_2\}), \quad (2)$$

wenn die Anregung mit einem im Vergleich zu den Abklingzeiten  $\gamma_{1,2}$  kurzen Lichtimpuls erfolgt. Der Faktor  $a$  hängt mit der absorbierten Anregungsenergie sowie der Effektivität des Fluoreszenznachweises zusammen.  $k_{F1,2}$  sind die Raten der strahlenden Desaktivierung des angeregten Zustandes für die beiden Farbstoffspezies. Im weiteren wird angenommen, daß  $k_{F1} = k_{F2}$  gilt; anderenfalls sind Eichmessungen z. B. an Lösungen bekannter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration heranzuziehen. Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration ist an ausreichend schwache Absorption und nicht zu starke Anregung gebunden.

Die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität liefert

$$I_F(t) = A_1 \exp\{-t/\gamma_1\} + A_2 \exp\{-t/\gamma_2\}. \quad (3)$$

Aus den Amplituden  $A_{1,2}$ , die in bekannter Weise durch Kurvenanpassung aus der gemessenen Abklingkurve erhalten werden können, ist gemäß (2) und für den Fall  $k_{F1} = k_{F2}$

$$A_2/A_1 = c_2/c_1, \quad (4)$$

woraus sich nach (1) mit

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot A_2/A_1 \quad (5)$$

unmittelbar die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ergibt.

Das Wesen der Erfindung soll an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. Eine zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Anordnung ist in Fig. 1 schematisch dargestellt.

Das biologische Objekt 1, dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen ist, wird gemäß üblicher Vorschrift mit dem Indikatorfarbstoff quin-2 oder fluo-3 eingefärbt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt durch einen mittels des Mikroskopobjektivs 2 fokussierten Laserstrahl 3, der in einem modensynchronisierten kontinuierlichen Laser 4 erzeugt wird und demzufolge aus einem Zug von Picosekundenimpulsen besteht. Das Strahlableitungs-system 5 dient der Positionierung des Laserfokus auf dem Objekt 1. Die vom Objekt 1 ausgehende Fluoreszenzstrahlung wird in Rückwärtsrichtung vom Mikroskopobjekt 2 erfaßt, am Teilerspiegel 6 reflektiert und gelangt auf den Sekundärelektronenvervielfacher 7. Dieser liefert Einzelphotonenimpulse, die in einem Meßsystem für zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung 8 registriert werden. Die Fluoreszenzabklingkurve, die den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Impulsanregung repräsentiert und von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängt (vgl. Fig. 2), wird in dem angeschlossenen Computer 9 ausgewertet, so daß das Verhältnis der Amplituden der beiden Fluoreszenzkomponenten, die von Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexen bzw. freien Farbstoffanionen herrühren, erhalten wird. Daraus wird mit der bekannten Dissoziationskonstante unmittelbar die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet. Sie kann nach Messung an vielen Punkten des Objektes 1 in Abhängigkeit von der mit der Kontrolleinrichtung 10 ermittelten Position des Laserstrahls als Rasterbild dargestellt werden.

Fig. 2 zeigt als Beispiel das Fluoreszenzabklingen für quin-2-Lösungen definierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes (a:  $10^{-6}$  mol/l, b:  $10^{-7}$  mol/l) bei festem pH-Wert 6,72 (Pufferlösung  $10^{-2}$  mol/l MOPS) und einer Wellenlänge 490 nm. Die Kurve c repräsentiert den Anregungsimpuls (Wellenlänge 350 nm).

#### Patentanspruch

Verfahren zur rastermikroskopischen Bestimmung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit einem solchen Indikatorfarbstoff, der auf eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute reagiert, eingefärbt und dann mit kurzen Lichtimpulsen zur Fluoreszenz angeregt werden, das Fluoreszenzlicht mit zeitlicher Auflösung registriert wird und durch Auswertung des Abklingverhaltens das Verhältnis der Anteile der beiden Fluoreszenzkomponenten, die dem freien Farbstoff einerseits und dem Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex andererseits entsprechen, und daraus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

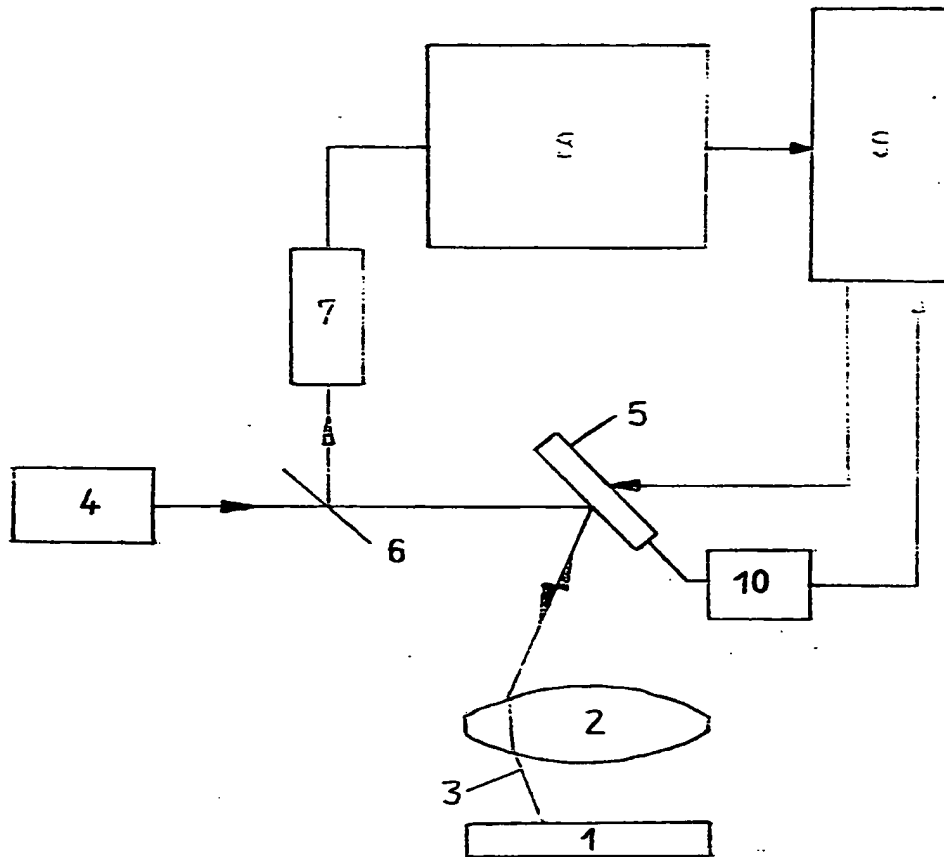


Fig. 1

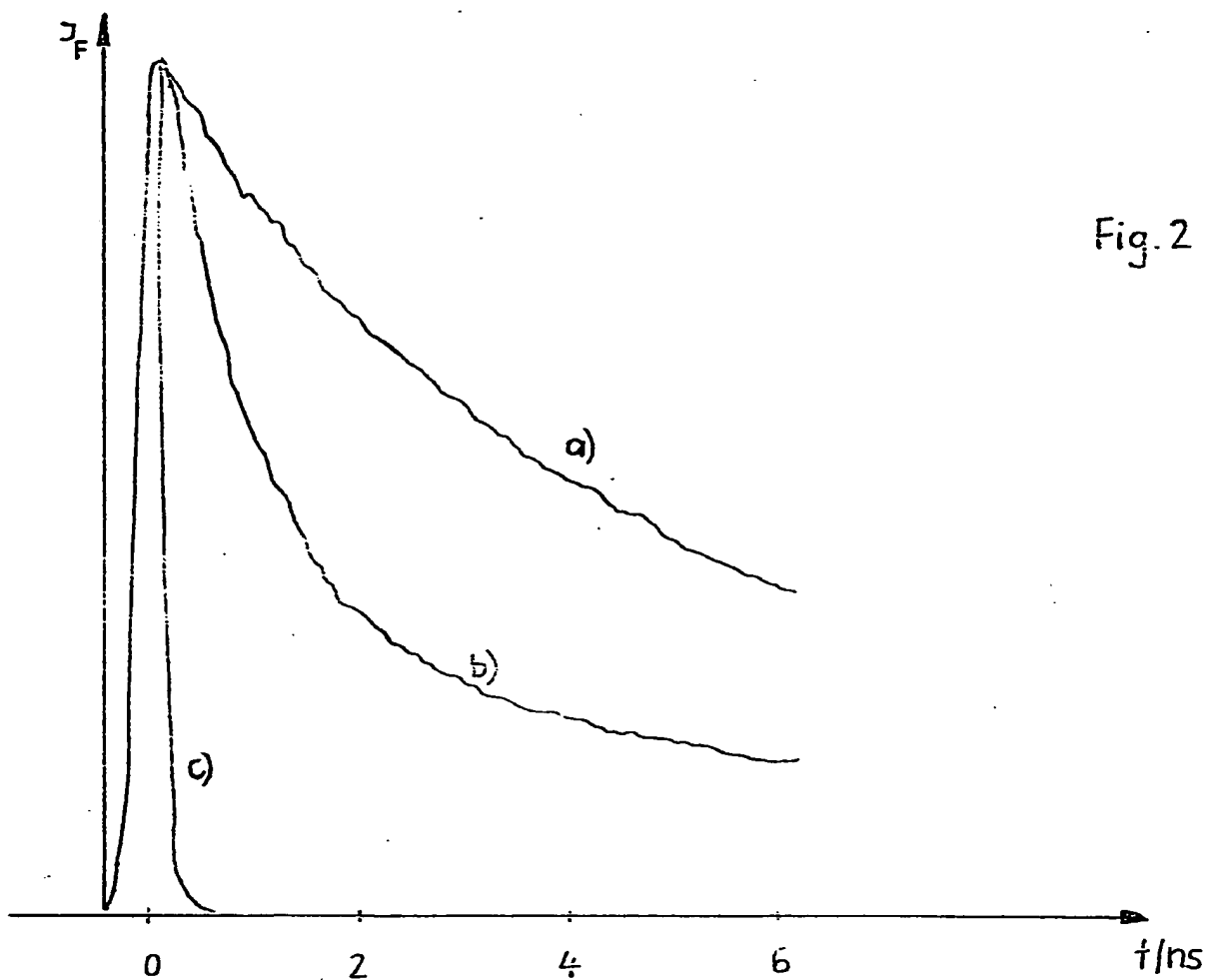


Fig. 2